

## STUDII CLINICE

### ACȚIUNEA IN VITRO A SUBSTANȚEI ACTIVE ADENOPROSIN ASUPRA LINIEI CELULARE DU 145 DE TIP CARCINOM DE PROSTATĂ

#### THE ACTIVE SUBSTANCE ADENOPROSIN ON PROSTATIC CARCINOMA CELLS LINE DU 145 IN VITRO ACTION

**Veaceslav CIUHRII**

*Director general, NEW TONE TRADING SRL*

#### Rezumat

Scopul studiului prezentat în acest articol a constat în stabilirea acțiunii substanței active ADENOPROSIN asupra liniei de celule ale carcinomului de prostată DU 145. În studiu au fost incluse liniile DU 145 de tip carcinom de prostată, androgen-nesensibilă și linia Hs 27 de fibroblaști umani normali. Substanța activă ADENOPROSIN reprezintă un complex de principii bioactive, obținut prin extragere hidroetanolică din larvele de prima vârstă de *Lymantria dispar*. Pentru stabilirea citotoxicității substanței a fost utilizată metoda reducerii sării de tetrazoliu și de determinare a lactatdehidrogenazei. Evaluarea proliferării celulare s-a realizat prin marcare fluorescentă. Pentru monitorizarea secvențialității ciclului celular și stabilirea apoptozei a fost utilizată citometria în flux. Rezultatele obținute demonstrează că ADENOPROSIN-ul acționează pe linia celulară de carcinom de prostată DU 145 reducând semnificativ indicele de proliferare prin blocarea sintezei materialului ereditat în faza S; nu manifestă toxicitate față de linia celulară Hs 27 de fibroblaști normali, ceea ce asigură acțiune față de celulele tumorale, fără a afecta celulele normale. Astfel, ADENOPROSIN-ul este un posibil agent antitumoral pentru carcinomul de prostată, care merită a fi studiat multilateral în scopul stabilirii mecanismelor de acțiune ale substanței active asupra celulelor maligne.

#### Summary

The article deals with the establishing in vitro action of the active substance ADENOPROSIN on prostatic carcinoma cells line DU 145. The study included 2 cells lines -DU 145 prostatic carcinoma cells, androgen-nonsensitive; and Hs27 normal human fibroblasts. ADENOPROSIN active substance is a complex of bioactive principles obtained by hydro-ethanolic extraction from the first age larvae of *Lymantria dispar*. To establish the cytotoxicity of the mentioned substance was used tetrazolium salt reduction method and determination of the lactate - dihydrogenase. Assessment of cell proliferation was done by the fluorescent labeling method. Monitoring of the sequence of cell cycle and apoptosis determination was done by flow cytometry. The obtained results show that ADENOPROSIN acting on prostate carcinoma cell line DU 145 by significantly reducing the proliferation index and blocking synthesis phase S. ADENOPROSIN shows no toxicity to the cell line 27 Hs of normal fibroblasts, to ensure action on tumor cells, without affecting normal cells. Thus, ADENOPROSIN is a possible antitumor agent for prostate carcinoma, which deserves to be studied to establish multilateral mechanisms of action of the active substance on malignant cells.

#### Introducere

Cancerul de prostată (CP) este unul din cele mai frecvente forme de cancer la bărbați, fiind al doilea după incidență, precedat doar de cel de plămâni și, cu părere de rău, manifestă o permanentă tendință de creștere. Deși cauzele dezvoltării cancerului de prostată rămân neelucidate, se subliniază că printre factorii de risc se numără apartenența rasială, vârsta înaintată, tipul de alimentație, comportamentul sexual etc. [1].

În ultimul timp se vehiculează ideea legăturii dintre hiperplazia benignă de prostată (HBP) și cancerul de prostată – maladii cu caractere anatomice, patologice și genetice comune, precum și tangențe epidemiologice pronunțate. Cercetările de ultimă oră demonstrează că HBP și CP sunt părți constitutive ale sindromului metabolic, în timp ce inflamația este factorul de bază în dezvoltarea ambelor patologii [2, 3]. Evidențierea

legăturii dintre hiperplazia benignă de prostată și factorii, care provoacă aceste două stări patologice poate asigura elaborarea strategiilor profilactice și a abordărilor terapeutice comune.

Substanța activă ADENOPROSIN, obținută prin extragere hidroetanolică din larvele de prima vârstă de *Lymantria dispar*, în forma ei farmaceutică de supozitoare rectală, 250 mg, este un preparat eficient în tratamentul pacienților diagnosticați cu HBP de gradul I și II și prostatite cronice atât în formă de monoterapie, cât și în cadrul terapiilor complexe, ameliorând parametrii urodinamici și starea pacienților cu HBP și prostatită cronică [4, 5]. Substanța activă ADENOPROSIN posedă stabilitate înaltă, acțiune antiradicalică și activitate antioxidantă specifică, care se manifestă prin inhibarea oxidării lipoproteinelor cu densitate joasă și prin reducerea radicalului oxidului nitric [6, 7].

În cazul stabilirii unei acțiuni specifice a ADENOPROSIN-ului asupra celulelor maligne, ar fi posibilă o inițiere a studiului posibilității utilizării acestui preparat nu numai în tratamentul HBP, dar și în calitate de remediu profilactic în dezvoltarea cancerului de prostată.

Pornind de la cele expuse mai sus, scopul acestei lucrări a constat în stabilirea acțiunii preparatului ADENOPROSIN asupra liniei de celule ale carcinomului de prostată DU 145.

## Materiale și metode

Linia de celule ale carcinomului de prostată DU 145 – linie celulară aderentă cu morfologie de tip epitelial; hipotriploidă; nesensibilă față de androgeni, slab pozitivă pentru fosfataza acidă; nu exprimă antigenul specific de prostată. Derivată dintr-un carcinom prostatic uman metastazat cerebral. Cultivarea a fost efectuată cu utilizarea mediului nutritiv EMEM cu 2mM L-glutamină, 1% aminoacizi neesențiali, 10% ser fetal bovin, 1% soluție antibiotic-antimicotic, la temperatura de 37°C în atmosferă de aer – 95% și CO<sub>2</sub> – 5%.

Linia celulară standardizată Hs27, care prezintă o cultură aderentă imortalizată de fibroblaști normali, derivată din piele umană. Cultivarea a fost efectuată pe mediul nutritiv DMEM cu 10% ser fetal bovin, 1% L-glutamină, 1% soluție antibiotic-antimicotic, la temperatura de 37°C în atmosferă de aer – 95% și CO<sub>2</sub> – 5%.

În calitate de substanță de referință a fost utilizat citostaticul metotrexat (inhibitor al biosintezei timidinei) care a fost aplicat în doză de 10 μM (valoarea recomandată ca fiind eficientă pe linia celulară DU 145).

Citotoxicitatea componentelor biologic active ale preparatului a fost stabilită prin evaluarea viabilității celulare utilizând metoda reducerii sării de tetrazoliu (MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-H-tetrazoliu). Compusul este redus de către dehidrogenazele celulelor metabolice active în formazan care este solubil în mediul de cultură. Cantitatea de formazan format este direct proporțională cu numărul de celule vii în cultură. Absorbanța formazanului la 490nm se masoară spectrofotometric direct în plăci ELISA. În paralel cu monitorizarea cantității formazanului a fost dozată cantitativ și enzima lactat dehidrogenaza (LDH) eliberată în mediul de creștere în condiții de stres și estimată în calitate de marker pentru moartea celulară. Evaluarea caracterului citotoxic a fost realizată corelând numărul celulelor viabile din cultura cu concentrația LD.

Evaluarea proliferării celulare s-a efectuat prin marcarea fluorescentă. Pentru marcarea se utilizează CFSE – carboxy fluorescein diacetat succinimidil ester – substanță nefluorescentă, care sub acțiunea esterazelor intracelulare genezează forma puternic fluorescentă a compusului. Aceasta reacționează cu aminele intracelulare, formând conjugați fluorescenți care sunt reținuți în celulă, iar în timpul diviziunii celulare sunt distribuiți egal între celulele fiice, permițând înregistrarea generațiilor celulare formate succesiv până la 8 cicluri de diviziune. Rezultatele se estimează ca Indice de Proliferare (IP) sau ca variație a procentului de celule în populația-mamă [8].

Pentru monitorizarea secvențialității ciclului celular a fost utilizată citometria în flux, cu ajutorul kitului "Cycle Test" Plus". Analiza prin citometrie în flux a celulelor normale și tumorale marcate diferențiat este utilizată pentru identificarea anomaliilor ADN-ului, pentru estimarea indicelui mitotic și pentru stu-

diul distribuției fazelor ciclului celular. Analiza secvențialității ciclului celular și estimarea procentului de celule în fazele de diviziune se face pe baza histogramelor de fluorescență analizate cu soft-ul specific FCS Express – Multicycle.

Apoptoza celulară a fost stabilită în urma analizei asimetriei lipidelor membranare [9] prin citometrie în flux conform instrucțiunilor de utilizare din buletinul tehnic însoțitor pentru kit-ul Annexin V-FITC apoptosis detection (BD Pharmingen), utilizând un citometru în flux BD FACSort prevăzut cu software CellQuest. Dubla marcarea cu iodura de propidiu (care se leaga de ADN-ul nuclear în condițiile degradării membranei celulare) conferă tehnicii posibilitatea estimării procentului de celule vii, a celui de celule apoptotice timpurii, apoptotice târzii sau necrotice.

## Rezultate

În scopul stabilirii citotoxicității substanței ADENOPROSIN asupra liniilor de celule DU 145 și Hs27 au fost realizate două serii de experiențe în triplicat, care s-au deosebit prin timpul de expunere a celulelor acțiunii preparatului – 48 și 72 ore, timpul de aderare a culturilor în toate cazurile fiind același – 48 ore. Preparatul a fost aplicat în următoarele concentrații: 0,50; 1,00; 1,67; 5,00 μg/ml. În calitate de martor pozitiv a fost utilizat metotrexatul, aplicat și el în triplicat în concentrație de 10 μM. În cadrul testelor au fost înregistrate absorbânțele specifice pentru formazan și pentru lactat dehidrogenază. Primul produs în continuare va fi estimat ca indicator al proliferării, iar cel de-al doilea – ca indicator al citotoxicității. Pentru a unifica rezultatele obținute, valorile înregistrate pentru martorul celular (MC) (atât pentru formazan, cât și pentru LDH) sunt considerate drept unitate, toate celelalte valori fiind calculate proporțional, raportate la martorul corespunzător.

Rezultatele obținute pentru aplicarea substanței ADENOPROSIN și a metotrexatului în cele două serii de experiențe pe linia celulară DU 145 sunt prezentate în Figura 1.

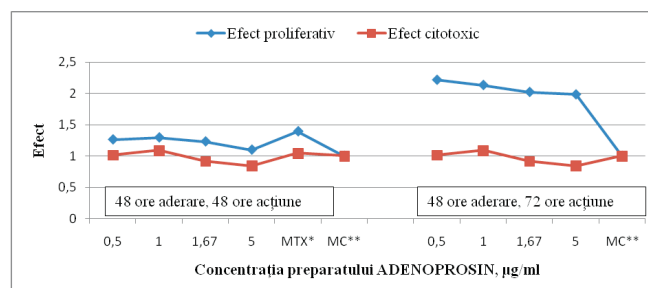


Figura 1. Efectul asupra viabilității și caracterul citotoxic al substanței ADENOPROSIN pe linia celulară DU 145.

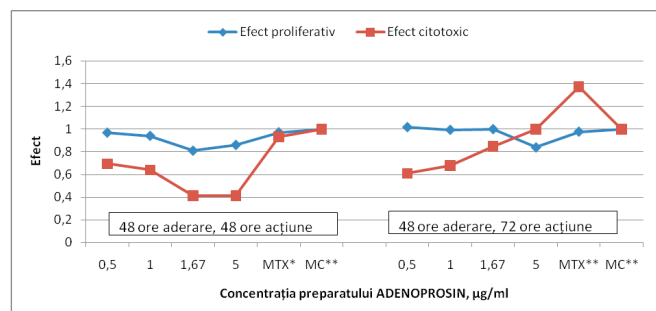
MTX\* – metotrexat 10μM; MC\*\* – martor celular

La expunerea celulelor acțiunii de 48 ore a agenților activi, în prezența metotrexatului (10 μM) se observă o ușoară stimulare a proliferării și un efect citotoxic slab asupra DU 145. Față de metotrexat, produsul testat are un efect de reducere a proliferării (de la 9 la 21%), care se accentuează pe măsura creșterii concentrației preparatului. Un efect citostatic al preparatului a fost înregistrat la concentrațiile de 1,67 și 5,00 μg/ml.

Timpul de expunere mai mare (72 ore) a liniilor celulare acțiunii substanței ADENOPROSIN a determinat efecte semnificative asupra celulelor, atât din punct de vedere al proliferării și viabilității, cât și al citotoxicității. La concentrații mari de substanță se observă citotoxicitate crescută, fapt indicat de valo-

rile mari de LDH eliberată și un efect citostatic al componentei bioactive, determinat de scăderea populației celulelor tumorale.

Rezultatele obținute pentru aplicarea preparatului ADENOPROSIN și a metotrexatului în cele două serii de experiențe pe linia celulară Hs27 sunt prezentate în Figura 2.

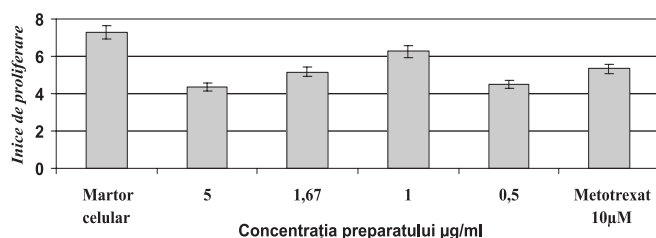


**Figura 2. Efectul asupra viabilității și caracterul citotoxic al substanței ADENOPROSIN pe linia celulară Hs27.**  
MTX\* – metotrexat 10μM; MC\*\* – martor celular

Experiențele pe fibroblaști umani linia celulară Hs 27 au relevat faptul că proliferarea nu este afectată de prezența ADENOPROSIN-ului. Citotoxicitatea înregistrată la acțiunea preparatului a fost scăzută comparativ cu cea înregistrată în proba-martor, dar a prezentat tendințe de creștere la mărirea concentrației și a duratei de acțiune a substanței active.

Pentru stabilirea indicelui de proliferare pentru linia celulară DU 145 au fost efectuate trei serii de experiențe, în care au fost utilizate aceleași concentrații ale preparatului ADENOPROSIN. Datele citometriei în flux au fost prelucrate statistic cu ajutorul softului specializat FCS Express și pot fi urmărite în Figura 3.

Trei dintre diluțiile testate inhibă proliferarea celulelor DU 145, reducând indicele de proliferare (IP), mai eficient decât metotrexatul în concentrație de 10 μM.



**Figura 3. Proliferarea celulelor DU 145, marcate cu CFSE, în prezența ADENOPROSIN-ului și a metotrexatului**

Studiul secvențialității ciclului celular de asemenea a fost realizat prin aplicarea tehnicii de citometrie în flux. A fost testată acțiunea a trei concentrații ale preparatului și anume: 0,5; 1,0 și 5,0 μg/ml. În Tabelul 1 sunt prezentate rezultatele secvențializării ciclului celular și determinării procentului de celule, care se află în faza S pentru mediile cu adaos a diferitor concentrații ale substanței ADENOPROSIN și cu adaos de metotrexat în concentrație de 10 μM, precum și pentru martorul celular.

Diferențele statistic semnificative ale indicelui de proliferare ( $P < 0.05$ ) sunt indicate prin: \*\*\* –  $P \leq 0.001$ ; \*\* –  $P \leq 0.01$ ; \* –  $P \leq 0.05$ ; ns – nesemnificativ ( $P \geq 0.05$ ); a – vs Martor, b – vs ADENOPROSIN, 5μg/ml

În cadrul experiențelor realizate s-a observat o reducere a numărului de celule aflate în faza S, de sinteză a ADN, până la valoarea de 28,8-32,5% în variantele experimentale față de

36,5 % cât s-a obținut la martorul celular. Este de menționat că linia DU 145 are un procent de celule în G2/M considerabil mai mare față de alte celule diploide, de aceea efectul de stopare a multiplicării celulare este apreciat prin însumarea procentelor de celule aflate în faza S și a celor în faza G2/M; astfel această sumă se reduce de la 48,73% pentru martorul celular la 38,58% pentru produsul testat.

**Tabelul 1**

**Date experimentale de secvențiere a ciclului celular obținute pe linia celulară DU 145 în prezența ADENOPROSIN-ului**

Varianta experimentală	% celule		
	Faza G0/G1	Faza S	Faza G2/M
Martor	51.22	36.53±0.427	12.20
ADENOPROSIN, 5μg/ml	61.08	28.80±0.5715***a	10.10
ADENOPROSIN, 1μg/ml	52.34	32.50±0.623**a, ***b	15.20
ADENOPROSIN, 0,5μg/ml	61.42	28.59±0.532***a,ns b	9.99
Metotrexat 10μM	73.27	26.50±0.473***a,ns b	0.20

Pentru stabilirea capacității de inducere a apoptozei pe linia celulară DU 145 au fost aplicate trei dintre concentrațiile substanței ADENOPROSIN și anume: 0,5; 1,0 și 5,0 μg/ml. Au fost cuantificate celulele cu semne de apoptoză timpurie, de apoptoză târzie și celulele moarte. Rezultatele obținute sunt expuse în Tabelul 2.

**Tabelul 2**

**Valorile parametrilor celulari caracteristici apoptozei**

Tip probă/ inductor de apoptoză	% celule vii	% celule apoptoză timpurie	% celule apoptoză târzie	% celule moarte
Martor	84.83	2.33	8.96	3.88
ADENOPROSIN, 5μg/ml	87.50	3.39	5.50	3.62
ADENOPROSIN, 1μg/ml	79.33	6.09	10.10	4.49
ADENOPROSIN, 0,5μg/ml	88.03	4.73	3.85	3.40

Datele experimentale obținute indică faptul că ADENOPROSIN 1μg/ml induce apoptoză timpurie, cu o diferență statistic veridică ( $P < 0,01$ ) de 2,61 ori mai mare față de martor.

## Discuții

Studiul toxicității substanței ADENOPROSIN față de liniile celulare studiate: DU 145 și Hs 27, a evidențiat activitatea biologică manifestată în dependență de doză și timpul de acțiune. Pornind de la faptul că DU 145 este o linie celulară tumorală de carcinom de prostată, ce reprezintă tipul de patologie tumorală spre care este orientat efectul biologic al preparatului ADENOPROSIN, se poate spune că aceste rezultate susțin studiile *in vivo* prin care a fost stabilită ameliorarea parametrilor urodinamici și starea pacienților cu HBP și prostatită cronică [4, 5]. De asemenea, ținând cont de faptul că forma farmaceutică în care se include substanța activă ADENOPROSIN pentru a fi folosită la tratamentul local al adenomului de prostată, este cea a supozitoarelor rectale, se poate spune că studiile pe fibroblaști sprijină soluția aleasă de condiționare. Astfel, lipsa citotoxicității sau valori moderate ale acesteia înregistrate pe

linia de fibroblaști umani normali, confirmă faptul, că utilizarea ADENOPROSIN-ului în diferite forme de condiționare (supozitoare, unguent) nu afectează celulele normale cu care vine în contact pe parcursul traseului său către situsul de acțiune.

Generalizând rezultatele evaluării acțiunii specifice *in vitro* a substanței active ADENOPROSIN asupra proliferării și secvențialității ciclului celular al celulelor de adenom de prostată tip DU 145 putem afirma că produsul acționează pe linia celulară de adenom de prostată DU 145 atât asupra proliferării acesteia, reducând semnificativ IP față de martorul de cultură, cât și asupra fazei de sinteză a ADN-ului, diminuând sinteza materialului genetic cu aproximativ 10% față de martorul de cultură. Diminuarea numărului de celule care se află în faza de dublare a materialului ereditar înainte de începerea diviziunii nemijlocite celulare, indică asupra acțiunii antiproliferative a preparatului.

Prin acțiunea sa pronunțată asupra multiplicării celulelor de carcinom de prostată, precum și datorită faptului că este un slab inductor de apoptoză, s-a demonstrat acțiunea specifică a substanței ADENOPROSIN asupra celulelor carcinomului de prostată.

Importanța rezultatelor obținute este susținută și de faptul că ADENOPROSIN-ul s-a dovedit a fi activ pe o linie de celule ale carcinomului de prostată androgen-nedependentă, cum este cea utilizată în studiu – DU 145. Faptul dat reiese

din aceea, că tumorile prostatice progresează foarte repede din starea androgen-dependentă spre cea nedependentă, ce complică esențial tratamentul și șansele de reușită [10]. Importanța testării activității antitumorale în cazul cancerului de prostată asupra liniilor celulare nesensibile acțiunii hormonilor androgeni este susținută și de alți cercetători, care au testat în așa mod extracte din plante, cum ar fi glicirizina din rădăcina de licorice [1], extractul polifenolic din rodie [11], cvercitrina [12], retinoidul sintetic 4HPR [13], combinația dintre docetaxel și acidul retinoic [14] în scopul stabilirii acțiunii lor asupra celulelor tumorilor prostatice.

## Concluzii

1. Substanța ADENOPROSIN acționează pe linia celulară de carcinom de prostată DU 145 reducând semnificativ indicele de proliferare prin blocarea sintezei materialului ereditat în faza S.
2. Substanța ADENOPROSIN nu manifestă toxicitate față de linia celulară Hs 27 de fibroblaști normali, ceea ce vorbește în favoarea condiționării ei în formă de supozitoare rectale.
3. ADENOPROSIN-ul este un posibil agent antitumoral pentru carcinomul de prostată, care merită a fi studiat multilateral în scopul stabilirii mecanismelor de acțiune asupra celulelor maligne.

## Bibliografie

1. THIRUGANAM S et al. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and Incap. In: *Oncology Reports*. 2008, v. 20: p. 1387-1392.
2. ALCARAZ A. et al. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. In: *Eur. Urol*, 2009, vol. 55(4), p.p. 864-873.
3. PRZYBYSZEWSKI W. M., RZESZOWSKA-WOLNY J. Stres oksydacyjny w procesach przerostu i kancerogenezy gruczołu sterczowego. In: *Postępy Hig Med Dosw.*, 2009; v. 63., p.p. 340-350.
4. CIUHRIL V. Biotehnologia obținerii formei medicamentoase pentru tratarea hiperplaziei benigne de prostată. Autoreferatul tezei de doctor în biologie. Chișinău, 2010, 30 p.
5. CIUHRIL V. Studiul eficienței supozitoarelor rectale ADENOPROSIN, 250 mg în tratamentul hiperplaziei benigne și proceselor inflamatorii ale prostatei. In: *Medicina alternativă. Fiziologie clinică și metode de tratament*. 2009, vol. 14, p.p. 12-18.
6. CIUHRIL V. Activitatea antiradicalică și antioxidantă a extractelor din biomasa de *Lymantria dispar*. In: *Intellectus*. 2009, nr. 3, p.p. 109-113.
7. RUDICV. et al. Evaluarea capacității unor remedii naturiste de a contracara oxidarea lipidelor *in vitro*. In: *Medicina alternativă. Fiziologie clinică și metode de tratament*. 2010, vol. 15., p. 16-24.
8. LUZYANINA T. et al. Computational analysis of CFSE proliferation assay. In: *Journal of Mathematical Biology*, 2007, v. 54, p.p. 57-89.
9. VAN ENGELAND M. et al. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. In: *Cytometry*, 1996, v. 24, p.p. 131-139.
10. ИБРАГИМОВА И. Идентификация новых потенциальных генов-супрессоров опухолевого роста, метилированных при раке предстательной железы. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Казань. 2008, 24 с.
11. HONG M. Y., SEERAM N. P., HEBER D. Pomegranate Polyphenols Downregulate Expression of Androgen Synthesizing Genes in Human Prostate Cancer Cells Overexpressing the Androgen Receptor. In: *J Nutr Biochem*. 2008; v. 19(12), p.p. 848-855.
12. KIM Y. et al. Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. In: *Biochem Pharmacol*. 2008, v. 75(10), p.p. 1946-1958.
13. HAIL N. Jr., CHEN P., KEPA J. J. Selective apoptosis induction by the cancer chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide is achieved by modulating mitochondrial bioenergetics in premalignant and malignant human prostate epithelial cells. In: *Apoptosis*. 2009; 14(7): p.p. 849-863.
14. KUCUKZEYBEK Y. et al. Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of surviving (BIRC5), MCL-1 and I $\beta$ teta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145. In: *J Exp Clin Cancer Res*. 2008; 27(1), p.p. 37-44.